



효소분리 및 용매정제법으로 제조한 고농도 Sialic Acid(23%)가 함유된 GMP 가수분해분말의 미생물복귀돌연변이시험 연구

김희경* · 조향현 · 노혜지

(주)메디뉴트롤

Bacterial Reverse Mutation Test Evaluation of Hydrolyzed GMP Powder Containing Highly Concentrated Sialic Acid (23%) produced by Enzyme Separation and Solvent Enrichment Method

Hee-Kyong Kim*, Hyang-Hyun Cho and Hye-Ji Noh

MEDINUTROL Co., Yeonggwang 57024, Korea

Abstract

The goal of this study was to develop hydrolyzed whey protein powder (23%-GNANA) manufactured with high content of sialic acid, a marker compound that is usually present at 7% concentration in GMP obtained from the milk protein. It is a safe food, used worldwide in infant and baby foods, etc. The test substance was prepared using (7% sialic acid containing) GMP as a raw material. Alcalase, an enzyme approved as a food additive, was used after separating sialic acid, with 100% efficiency, and 23%-GNANA (composed of 23% sialic acid and protein; product name: HELICOBACTROL-23), provided by MEDINUTROL Inc. (Korea), manufactured to have high (23%) content through ethanol soaking and enrichment. Bacterial reverse mutation (Ames) test was conducted in accordance with the GLP Guideline using the test substance specified above. To detect its mutagenicity potential in microorganisms, histidine auxotrophic strains of *Salmonella typhimurium*, TA98, TA100, TA1535, and TA1537, and tryptophan auxotrophic *Escherichia coli* strain, WP2uvrA, were used. The bacterial reverse mutation (Ames) test was performed using five concentrations of the test substances (0, 61.7, 185, 556, 1,670, 5,000 µg/plate). The evaluation did not reveal repetitive increase of colony generating values and positive criteria for reverse mutagenicity for any tested concentration in the five strains regardless of the presence of metabolic activation system, and no dose-dependency. In conclusion, the safety of 23%-GNANA test substance was verified by the bacterial reverse mutation test conducted before registration of 23%-GNANA as a food additive.

Keywords: glycomacropeptide (GMP), sialic acid, bacterial reverse mutation test, food material development

서 론

우유에 렌넷을 첨가하면 chymosin의 작용으로 인해 우유 단백질은 두 부분으로 나누어지는데, 106~169잔기를 GMP (Glycomacropeptide) 라고 한다(Yoon *et al.*, 2000). GMP는 세

균과 부착하는 능력을 가지고 있고, *Bifidobacterium*의 생장촉진 및 박테리아와 바이러스의 장기접착을 억제효능을 가지고 있으며(Ernest, 2000), N-acetylneuraminic acid(sialic acid), galactose(gal), N-acetylgalactosamine(GalNAc)의 3개의 당이 3개 또는 4개가 Thr나 Ser 잔기에 연결되어 있으며, sialic acid를 자르는 효소를 neuraminidase라고 한다(Fig. 1)(Moon *et al.*, 2005).

Sialic acid는 단당으로 세포나 수용성 단백질에 당사슬 형

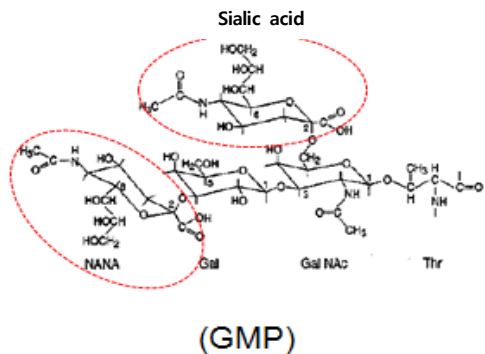
* Corresponding author: Hee-Kyong Kim, MEDINUTROL Co., Yeonggwang 57024, Korea. Tel: +82-61-352-2166, Fax: +82-61-352-2167, E-mail: mulsambong@naver.com

태로 부착되어 있으며, 고등동물의 세포나 미생물에서 glucose로부터 복잡한 과정을 거쳐 생성된다(Wang *et al.*, 2003). Sialic acid는 인체내 수용기의 인지, 신경 신호전달 등에 역할을 하며, 뇌의 ganglioside의 구조와 기능에 역할을 하는 구성 물질이고(Wang *et al.*, 2003; Schauer *et al.*, 1984; Wang *et al.*, 2001), 뇌의 발달과 인지능력에 중요한 역할을 하는 필수 성분으로 영아기에 섭취는 기억과 학습 능력 향상에 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Wang *et al.*, 2001; Wang, 2009; Karim *et al.*, 2007; Gorog and Kovacs, 1978). 최근에는 항염증 효과나 몸속의 과산화수소 제거 등의 기능성이 알려지면서 기능성 식품으로 연구되어지고 있다. 현재 시판 중인 sialic acid는 대부분 재조합 *E. coli*에서 합성되거나, 이들로부터 생산된 효소를 이용해 N-acetyl-D-glucosamine으로 부터 합성되며, 일부가 화학적 합성방법으로 생산되어 의료용으로 대부분 사용되고 있다(Iijima *et al.*, 2004). 유청 단백질에서 분리한 sialic acid를 식품산업에 적용된 예는 국내외적으로 아직까지는 없다. 건강기능성 식품원료 등록을 위하여 필수적으로 수행되는 항목인 미생물복귀돌연변이시험에서 일반적으로 살모넬라균(*Salmonella typhimurium*) 또는 대장균(*Escherichia coli*)을 이용하는데, 살모넬라균은 히스티딘 요구성의 변이를, 대장균은 트립토판 요구성의 변이를 지표로 한다. 이들 균주는 유전독성 유발물질에 대해 높은 감수성을 나타내는 유전적 형질을 가지고 있어 유전독성시험에 널리 이용되고 있다(Maron *et al.*, 1983).

본 연구에서는 GMP 내 지표성분인 sialic acid를 식품소재로 활용성을 높이기 위하여, GMP 가수분해단백(23%-GNANA)을 미생물복귀돌연변이시험용 공시균주를 이용하여 GLP가이드라인 기준에 준하는 안전성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 시험물질 준비



Neuraminidase type →

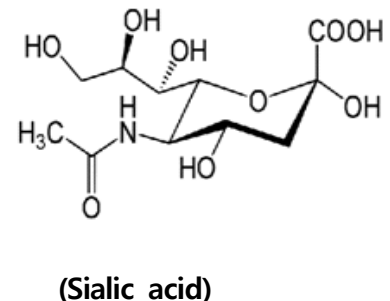


Fig. 1. Sialic acid production from GMP by Alcalase 2.4FL (Neuraminidase Type Enzyme)

GMP는 sialic acid가 7%가 결합된 형태로 판매되는 NatraPep GMP (Murry Goulburn Co-Operative Co., Australia)을 구입하여 원료로 사용하였다. 시험물질 제조를 위하여, 정제수에 7% (w/v)되게 GMP를 용해시킨 후 효소 Alcalase 2.4FL(Novozymes Co., Denmark)를 기질 대비 0.24%(w/v)로 혼합하여 7시간(57°C) 동안 가수분해를 시켰다(Fig. 1). 그리고 가수분해 용액 2와 에탄올의 비율이 8이 되도록 혼합하였다. 그리고 에탄올 혼합에 따라 생성된 침전물을 제거한 후, 상등액만을 동결건조시켜 제조한 HELICOBACTROL 제품(23%-GNANA)을 한일 바이오메드사(한국)로부터 공여 받아 시험물질로 사용하였다(Fig. 2).

2. 시험물질 내 지표성분 Sialic acid 분리 및 함유량 검정

10 mM Sodium Acetate Buffer 용액에 시험물질인 7%-GNANA를 완전히 용해시킨 후, 에탄올 8 mL에 희석액 2 mL를 혼합한 후 Sonication(25°C) 및 원심분리(3,000 rpm × 20 min, 25°C) 과정을 거쳐 상등액만을 0.22 μm membrane으로 여과 후 이를 최종 HPLC System(Agilent 1260, USA) 시료로 사용하였다(Table 1). 분석간 검출허용 표준편차는 90~110% 범위 내에서 평가하였다(Table 1, Fig. 1). 시험물질 내 지표성분인 sialic acid의 분리 여부 및 함유량 검정을 위한 표준체 sialic acid는 Sigma-Aldrich사(A2090)을 구입하여 0.1 ppm(w/w), 1 ppm 및 10 ppm 되게 희석하여 분석간 표준용액으로 사용하였다.

3. 미생물복귀돌연변이시험

1) 시험용 균주 준비

표준균주로 *Salmonella typhimurium* 계열의 돌연변이 균주인 TA98, TA100 및 TA1535, TA1537을 그리고 *Escherichia coli*의 돌연변이 균주인 WP2uvrA를 전체 시험 간 이용하였으며, MOLTOXTM(USA)로부터 구입하여 전체 시험 간 사용하였다.

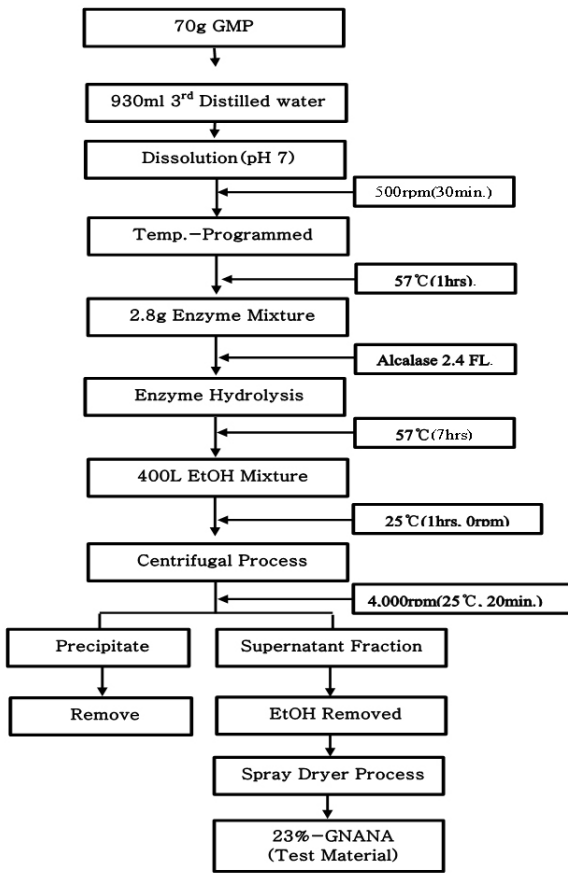


Fig. 2. Manufacturing process diagram for 23%-GNANA, a test substance containing 23% sialic acid, through the enzyme (Alcalase 2.4 FL) separation mechanism of sialic acid, the marker compound having the Glycomacropeptide (GMP) as a substrate, and the ethanol refining process

2) 시험용 균주 시험용 배지조성

Plate 배지는 Top Agar와 Vogel-Bonner 최소 Glucose 한천 배지를 Maron 및 Ames의 방법(1983)의 시험법에 준하여 제조 및 사용하였다.

3) 시험균주의 유전형질 확인

시험균주는 Maron 및 Ames의 방법(1983)에 따라 아미노산 요구성, UV 민감도, rfa 돌연변이 및 R-factor 유지 여부 등의 확인 시험을 수행하여 유전형질이 잘 유지되고 있음을 시험전에 확인하였다.

4) 양성대조물질 조성 및 처리조건

표준균주별 감수성 평가를 위한 양성대조물질로서는 sodium azide(NaN₃), 9-aminoacridine(9-AA), 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO) 및 2-aminoanthracene(2-AA)와 용매로서는 dimethyl

Table 1. HPLC operation conditions for analysis of sialic acid

| HPLC system (Agilent 1260) | 2. Analysis conditions |
|----------------------------|--|
| · Pump: G1311C | · Wavelength: 205 nm |
| · Auto sampler: G1329B | · Column: Aminex® HPX-87H Ion Exclusion Column (300×7.8 mm, 9 μm, Bio-Rad Co.) |
| · Column: G1316A | · Mobile phase: 10 mM H ₂ SO ₄ |
| · UV detector: G1314F | · Running time: 20 min |
| | · Flow rate: 0.5 mL/min |
| | · Injection volume: 10 μL |
| | · Temperature: 40°C |
| | · Standard sol.(w/w): Sialic acid 0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm |

Table 2. Name and applied concentration of positivity comparison substance used in the evaluation of Bacterial Reverse Mutation for 23%-GNANA holding the sialic acid as a marker compound

| Bacteria name | Division | S9Mix(+) | | S9Mix(-) | |
|--------------------------------|----------|------------------|--------------------------|------------------|--------------------------|
| | | Positive control | Concentration (μg/plate) | Positive control | Concentration (μg/plate) |
| <i>Sal. typhimurium</i> TA98 | | 4-NQO | 0.5 | 2-AA | 0.5 |
| <i>Sal. typhimurium</i> TA100 | | NaN ₃ | 1.5 | 2-AA | 1.0 |
| <i>Sal. typhimurium</i> TA1535 | | NaN ₃ | 1.5 | 2-AA | 2.0 |
| <i>Sal. typhimurium</i> TA1537 | | 9-AA | 80 | 2-AA | 2.0 |
| <i>E. coli</i> WP2uvrA | | 4-NQO | 0.5 | 2-AA | 10 |

sulfoxide(Sigma-Aldric Co., USA)를 사용하였다. 대사활성계 미처리(S9mix-) 조건에서 양성대조물질은 2-AA를 공식균종에 따라 0.5~10 μg/plate 범위에서 농도 처리를 다르게 하였다. 대사활성계 처리(S9Mix+) 조건에서 *Sal. typhimurium* TA98 와 *E. coli* WP2uvrA 균주는 4-NQO를 0.5 μg/plate 그리고 *Sal. typhimurium* TA100과 TA1535는 NaN₃를 1.5 μg/plate, *Sal. typhimurium* TA1537 균주는 9-AA를 80 μg/plate으로 양성대조물질을 처리하는 조건으로 실시하였다(Table 2).

5) S9 Mixture 조성

대사활성계 처리(S9Mix+) 시 복귀돌연변이시험을 위하여, Sprague Dawley male rat에 유도물질인 Aroclor 1254을 도살 5일전 단회 복강투여 후 간조직을 적출 및 균질화 한 후 -20°C에서 보관된 S9(MOLTOX사, USA)을 구입하여 시험에 사용하였다. S9 mixture의 조성은 Table 3과 같이 제조하였다.

6) 시험군 구성

Table 3. S9 Mixture spectrum table for evaluation of standard susceptibility with the treatment of 23%-GNANA by each concentration level, a test substance, effecting on bacterial reverse mutation

| S-9 | 1 | | 3 | |
|------------------------------|-----|----|-----|------|
| S-9(mL) | 2.1 | 2 | 6.3 | 5.5 |
| 20 mM HEPES (mL) | 6 | | 15 | |
| 50 mM MgCl ₂ (mL) | 3 | | 7.5 | |
| 330 mM KCl (mL) | 3 | 18 | 7.5 | 49.5 |
| 50 mM G-6-P (mL) | 3 | | 7.5 | |
| 40 mM NADP · Na (mL) | 3 | | 7.5 | |
| Diatilled water(mL) | 3 | | 7.5 | |
| SUM(mL) | 20 | | 55 | |

시험물질을 예비농도설정 시험결과를 적용하여 본 시험에서는 최고투여농도인 5,000 µg/plate를 최고농도로 설정하였다(Table 4). 대사활성계 처리 및 미처리 조건에서 5,000 µg/plate를 최고농도로 설정하고, 공비 3으로 5단계의 농도군(0,

61.7, 185, 556, 1,670, 5,000 µg/plate)을 적용하였다.

7) 표준시험방법

시험물질 처리에 따른 미생물복귀돌연변이시험은 의약품 등의 독성시험기준(OECD test guideline(OECD), 2008; Schauer *et al.*, 1984)와 OECD guideline for the testing of chemicals(Takahashi *et al.*, 1992; Wang, 2009)에 준하여 Plate법으로 수행하였다.

8) 평가기준

표준균주별 정상 성장범위를 *Sal. typhimurium* TA98는 15~60 cfu/plate, TA100는 60~200 cfu/plate, TA1535는 10~40 cfu/plate, TA1537는 5~20 cfu/plate 그리고 *E. coli* WP2uvrA 경우는 10~40 cfu/plate 범위내에서 집락수를 나타내는 경우를 시험물질에 대하여 안전성을 보이는 정상범위로 평가하였다. 시험물질에 대한 복귀돌연변이 평가는 대사활성계 존재 유무에 관계없이 최소 1개 균주에서 플레이트 당 복귀된 집락수에 있어서 1개 이상의 농도에서 재현성 있는 증가를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

Table 4. The result of concentration range setting test conducted to evaluate the effect on increase & decrease of reverse mutation colonies by the addition of 23%-GNANA, a test substance, under the presence and absence conditions of metabolic activation system

| With and without metabolic activation | Test materials conc. (µg/plate) | Number of colony (cfu/plate) | | | | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------|
| | | Base substitution types | | | Frameshift types | | |
| | | TA100* | TA1535* | WP2uvrA* | TA98* | TA1537* | |
| S9Mix(-) | 0 [#] | 102.3±8.08 [#] | 31.7±2.08 [#] | 32.7±4.62 [#] | 46.7±4.73 [#] | 13.3±1.53 [#] | |
| | 312 | 108.3±6.81 | 33.7±0.58 | 36.7±1.15 | 50.7±3.06 | 14.0±1.00 | |
| | 625 | 109.0±9.54 | 37.3±2.08 | 34.7±4.16 | 51.7±4.73 | 14.3±2.08 | |
| | 1,250 | 115.0±3.00 | 35.7±4.16 | 36.0±0.00 | 51.7±2.31 | 11.7±3.06 | |
| | 2,500 | 112.3±3.51 | 32.3±1.53 | 36.0±4.36 | 50.3±3.06 | 11.3±2.08 | |
| | 5,000 | 124.3±18.88 | 32.3±3.06 | 35.3±3.06 | 49.0±1.00 | 12.3±3.51 | |
| S9Mix(+) | 0 [#] | 144.7±3.79 | 33.7±2.52 | 35.3±3.06 | 52.7±3.21 | 13.3±0.58 | |
| | 312 | 147.3±12.66 | 37.0±2.65 | 32.7±2.31 | 48.0±3.61 | 13.0±2.00 | |
| | 625 | 147.0±9.17 | 33.3±4.04 | 34.0±5.29 | 49.0±4.36 | 11.7±0.58 | |
| | 1,250 | 139.7±8.33 | 31.7±2.52 | 32.0±4.00 | 51.0±3.00 | 15.7±1.53 | |
| | 2,500 | 144.0±5.00 | 33.7±3.21 | 32.0±2.00 | 50.3±3.06 | 12.7±2.08 | |
| | 5,000 | 150.0±6.56 | 32.3±3.21 | 31.3±4.16 | 49.3±3.79 | 15.3±2.08 | |
| Positive control | S9Mix(-) | Materials | NaN ₃ | NaN ₃ | 4-NQO | 4-NQO | 9-AA |
| | | Conc. (µg/plate) | 1.5 | 1.5 | 0.5 | 0.5 | 80 |
| | S9Mix(+) | cfu/plate | 357.7±9.61 | 159.3±8.62 | 260.0±24.98 | 252.7±4.93 | 136.0±7.00 |
| | | Materials | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA |
| | | Conc. (µg/plate) | 1.0 | 2.0 | 10 | 0.5 | 2.0 |
| | | cfu/plate | 372.7±13.01 | 160.0±22.72 | 283.3±20.03 | 259.3±22.48 | 204.7±15.31 |

*: TA98 (*Sal. typhimurium* TA98), TA100 (*Sal. typhimurium* TA100), TA1535 (*Sal. typhimurium* TA1535), TA1537 (*Sal. typhimurium* TA1537), WP2uvrA (*E. coli* WP2uvrA), #: Represents a significant difference at p<0.01 level compared with the vehicle control

9) 복귀돌연변이 평가항목

Sal. typhimurium TA100, TA1535와 *E. coli* WP2uvrA는 복귀돌연변이 평가 시 염기치환형을 그리고 *Sal. typhimurium* TA98과 TA1537의 경우는 Frameshiht형에 대한 평가를 실시하였다.

결 과

1. 시험물질 내 지표성분 함유량 평가

시험물질 내 sialic acid의 분리 및 함유량을 HPLC 분석법을 적용하여 평가한 결과, GMP 내 결합되어 있던 sialic acid는 100% 효율로 분리되었으며, 23.6±1.34%의 sialic acid와 GMP 유래의 단백질로 구성되어 있었다(Fig. 3).

2. 시험물질의 미생물복귀돌연변이 평가

1) 실험농도설정시험

양성대조물질처리에 따른 표준균주들에 대한 표준 감수성을 검증한 후, 본 시험을 위해 시험물질을 5,000 µg/plate를

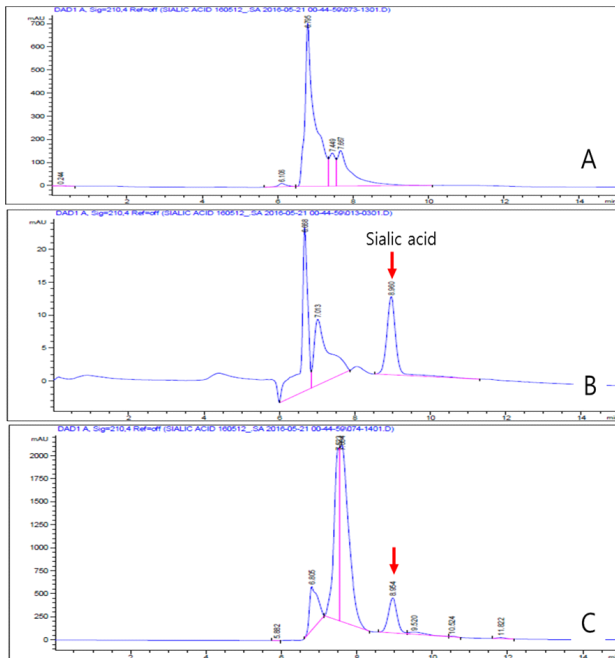


Fig. 3. Result of evaluation for separation and content of sialic acid in hydrolyzed whey protein (23%-GNANA), a test substance, vs. the standard sialic acid applying the HPLC analysis method. A: Non-enzymatically Modified GMP, B: Standard sialic acid (25 ppm), C: Result of sialic acid detection in 23%-GNANA. 23%-GNANA was prepared through the ethanol enriching process and final hot air drying process after treating the 0.2% (v/v) Alclase for 1 hour (40 °C) versus GMP.

최고농도로 하여 0, 312, 625, 1,250 그리고 2,500 µg/plate에서 모든 균주에서 유의한 생육저해가 없었기 때문에 이를 기준으로 본 시험은 5,000 µg/plate을 최고농도로 설정하였다 (Table 4).

2) 미생물복귀돌연변이 평가

전체균주에 대하여 양성대조물질 처리를 통한 표준 감수성 확인한 결과, 대사활성계 처리의 경우 TA100, TA1535, WP2uvrA, TA98 및 TA1537 균주는 각각 393±19.7, 240±34.7, 248±26.2, 355±33.6 그리고 143.3±25.3 colonies/plate이었고, 미처리 경우는 381±44.6, 185±5.03, 292±23.0, 256±32.0 그리고 267±24.95 cfu/plate의 수치를 보였는데, 사전 설정된 표준범위에 해당되었다.

음성 대조군 및 동일한 5단계의 농도조건에서 대사활성계 미처리 조건에서 균주별 생존콜로니 수치를 확인하여 보았더니, TA100 균주는 음성 대조군의 경우는 124±7.77 cfu/plate

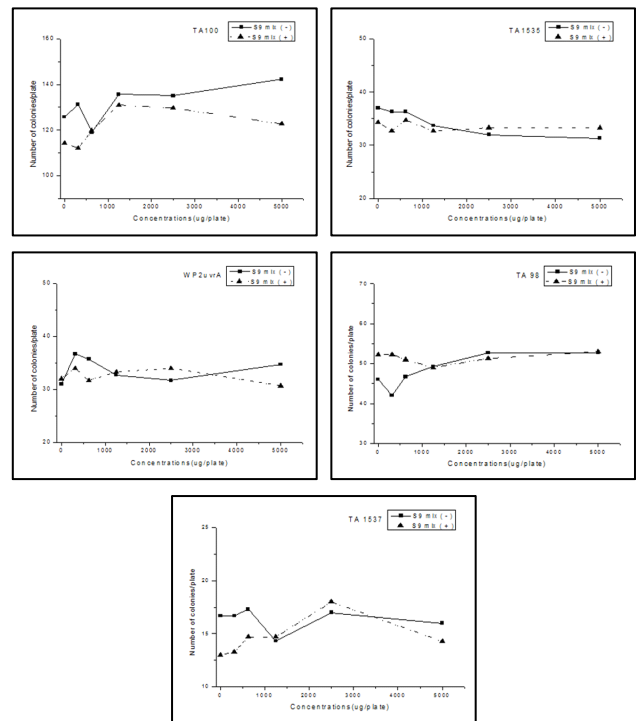


Fig. 4. The result of evaluation conducted to evaluate the effect on increase & decrease of reverse mutation colonies by the addition of 23%-GNANA, a test substance, under the presence and absence conditions of metabolic activation system versus the solvent control group. TA98 (*Sal. typhimurium* TA98), TA100 (*Sal. typhimurium* TA100), TA1535 (*Sal. typhimurium* TA1535), TA1537 (*Sal. typhimurium* TA1537), WP2uvrA (*E. coli* WP2uvrA), S9 Mix (-): without metabolic activation, S9 Mix(+): with metabolic activation

Table 5. The result of evaluation (main study) conducted to evaluate the effect on increase & decrease of reverse mutation colonies by the addition of 23%-GNANA, a test substance, under the presence and absence conditions of metabolic activation system

| With and without metabolic activation | Test material conc. (µg/plate) | Number of revertant colony (cfu/plate) | | | | |
|---------------------------------------|--------------------------------|--|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | | Base substitution types | | | Frameshif types | |
| | | TA100* | TA1535* | WP2uvrA* | TA98* | TA1537* |
| S9Mix(-) | 0 [#] | 125.7± 6.03 [#] | 37.0±1.00 [#] | 31.0±1.00 [#] | 46.0±4.00 [#] | 16.7±2.52 [#] |
| | 312 | 131.3± 5.03 | 36.3±2.08 | 36.7±0.58 | 42.0±10.39 | 16.7±1.53 |
| | 625 | 119.0±13.53 | 36.3±3.06 | 35.7±2.52 | 46.7±1.15 | 17.3±1.53 |
| | 1,250 | 135.7±11.85 | 33.7±4.16 | 32.7±2.31 | 49.3±2.31 | 14.3±3.51 |
| | 2,500 | 135.0± 7.00 | 32.0±4.58 | 31.7±0.58 | 52.7±3.51 | 17.0±1.73 |
| | 5,000 | 142.3±10.02 | 31.3±3.51 | 34.7±3.21 | 52.7±4.93 | 16.0±2.00 |
| S9Mix(+) | 0 [#] | 114.3± 9.29 | 34.3±3.21 | 32.0±4.00 | 52.3±4.04 | 13.0±1.73 |
| | 312 | 112.0± 9.54 | 32.7±3.06 | 34.0±4.00 | 52.3±5.86 | 13.3±2.89 |
| | 625 | 119.7± 2.08 | 34.7±1.15 | 31.7±2.52 | 51.0±4.58 | 14.7±2.31 |
| | 1,250 | 131.0± 7.21 | 32.7±6.03 | 33.3±2.31 | 49.0±7.00 | 14.7±4.04 |
| | 2,500 | 129.7±11.85 | 33.3±1.15 | 34.0±2.00 | 51.3±9.29 | 18.0±1.73 |
| | 5,000 | 122.7± 5.51 | 33.3±1.53 | 30.7±1.15 | 53.0±4.36 | 14.3±4.04 |
| Positive control | S9Mix(-) Materials | NaN ₃ | NaN ₃ | 4-NQO | 4-NQO | 9-AA |
| | S9Mix(-) Conc. (µg/plate) | 1.5 | 1.5 | 0.5 | 0.5 | 80 |
| | S9Mix(-) cfu/plate | 393.3±19.73 | 240.0±34.70 | 248.0±26.23 | 355.0±33.60 | 143.3±25.32 |
| | S9Mix(+) Materials | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA | 2-AA |
| | S9Mix(+) Conc. (µg/plate) | 1.0 | 2.0 | 10 | 0.5 | 2.0 |
| | S9Mix(+) cfu/plate | 381.3±44.60 | 185.3±5.03 | 292.0±23.07 | 256.0±32.00 | 267.3±24.95 |

*: TA98 (*Sal. typhimurium* TA98), TA100 (*Sal. typhimurium* TA100), TA1535 (*Sal. typhimurium* TA1535), TA1537 (*Sal. typhimurium* TA1537), WP2uvrA (*E. coli* WP2uvrA), [#]: Represents a significant difference at $p<0.01$ level compared with the vehicle control

였는데, 시험물질 처리구의 경우는 최저 119±13.53 cfu/plate 에서 최대 142±10.02 cfu/plate 범위에서 검출되었다. TA1535 균주는 허용범위인 32.0±4.58 cfu/plate에서 37.0±1.00 cfu/plate, WP2uvrA 균주는 31.0±1.00~36.7±0.58 cfu/plate, TA98 균주는 42.0±10.3~52.7±3.51 cfu/plate 그리고 TA1537는 최저 16.7±1.53 cfu/plate에서 최대 17.3±1.53 cfus/plate 범위에서 콜로니가 출현하였다. 이러한 결과는 표준 균주별로 안전성과 관련한 허용 범위 내에서의 수치였으므로 시험물질은 농도와 상관없이 안전한 것으로 평가되었다. 대사활성화계 처리의 경우도 시험균별 균주의 차이는 다소 있었지만, 역시 대사활성계 미처리 시험 결과와 유사한 결과를 보였다. 따라서, 전체 표준균주에 시험물질인 23%-GNANA를 농도별로 처리 시 대사활성계 미처리 및 처리조건에서 안전한 것으로 확인되었다(Table 5, Fig. 4).

고 찰

우유 및 유제품에 함유된 카제인 유래 생리활성 peptide가

생체 내에서 심혈관계, 신경계, 면역계 및 영양계에 걸쳐 중요한 기능을 한다는 사실이 밝혀진 이래로 현재까지 이에 대한 여러 연구가 진행되어 왔다. 유단백질 중 영양학적인 관점에서 본 생리활성 peptide로는 CPP와 GMP를 들 수 있는데, GMP는 분자량이 크기 때문에 그 자체로 흡수될 수 없어서 분자량이 작은 peptide로 분해된 후 흡수되어야 한다. GMP의 아미노산 구성성분은 방향족 아미노산이 부족한 반면, 측쇄 아미노산(UAL, ILU)과 낮은 MET 함량을 갖는 독특한 아미노산 조성은 phenylketonurine 환자의 diet 소재와 간 질환의 치료(Marshall *et al.*, 1991) 및 Hypoallegic Food 등으로 개발이 가능하다고 할 수 있다(Takahashi *et al.*, 1992). 또한, 칼슘, 철 및 아연의 흡수에 도움을 주는 것으로 알려져 있는데, Kelleher 등(2003)이 Rh(Rhesus) 인자를 가진 어린 원숭이에게 GMP와 조제용 분유의 α-lactalbumin 성분을 보충했을 때에 나타나는 변화를 관찰하였는데, 양쪽 모두에서 아연흡수의 증가를 관찰하였다. 영양적인 측면 이외에도 충치예방(Aimutis *et al.*, 2004)에 있어 유제품에 포함된 생리활성 peptide에 관한 기능성 연구가 GMP가 안전성을 보유하는 기반에서 진행되어 왔다.

본 연구에서는 GMP 내 지표성분인 sialic acid를 효소분리 시킴과 동시에 GMP 단백질원을 아미노산 형태로 가수분해 함으로써 이들의 기능성을 동시에 제품개발에 활용하고자 하였다. 그러나, 인위적으로 원료 GMP의 변형 유발과 기능성 식품으로 개발을 목표로 하고 있기 때문에 시험물질의 안전성 평가는 필수적이라고 할 수 있다. 본 연구에서도 미생물복귀돌연변이시험 결과에서 대사활성계 존재 유무에 관계 없이 모든 균주는 모든 농도에서 재현성 있는 증가를 나타내지 않았으며, 용량의존성도 확인되지 않았음에 따라 GMP를 원료로 제조한 23%-GNANA는 복귀돌연변이 유발원이 아닌 것으로 판정되었다. 따라서, 본 시험의 목표인 안전식품인 GMP를 원료로 23% sialic acid를 분리 및 이를 고농도로 함유토록 제조된 시험물질은 단지 원료인 GMP 수준의 안전한 식품소재임이 확인되었다.

요 약

본 시험은 안전식품인 우유단백질에서 분리되어 영유아 식품 등에 세계적으로 사용되고 있는 GMP 내 기본적으로 7%로 결합되어 있는 지표성분인 sialic acid의 함유량이 높게 제조한 23%-GNANA를 기능성 식품 원료 개발함에 최종 연구 목표를 두었다. 시험물질은 23% sialic acid와 GMP 단백질로 구성(제품명: HELICOBACTROL-23)되어 있으며, (주)한일바이오테크(한국)에서 공여 받아 미생물복귀돌연변이시험을 실시하였다. 미생물에 대한 돌연변이 유발성 유무를 검색하기 위해 히스티딘 요구성 균주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 및 TA1537과 트립토판 요구성 균주인 *Escherichia coli* WP2uvrA를 이용하였다. 미생물복귀돌연변이시험은 시험물질을 5단계의 농도군(0, 61.7, 185, 556, 1,670, 5,000 µg/plate)으로 하여 평가하였다. 평가결과로서, 대사활성계 존재 유무와 관계없이 5균주 모두에서 시험물질의 각 농도에 의한 복귀돌연변이 유발원 양성기준인 콜로니 생성수치가 재현성 있는 증가를 나타내지 않았으며, 용량의존성도 확인되지 않았다. 결론적으로, 시험물질인 23%-GNANA의 식품첨가물로서 등록을 위하여 수행한 미생물돌연변이시험에서 안전성이 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부(기질 특이적 유기태화-미네랄류 제조법 확립을 통한 다기능성 사료첨가제 개발 및 수출용 기능성 미네랄 강화란 대량생산시스템 정립, 고부가가치식품개발산업, 제 113024-3호)에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Aimutis, W. R. 2004. Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. *J. Nutr.* 134: 989-995.
2. Ernest, P. B. 2000. Biological activities of bovine glycomacropeptide. *British Journal of Nutrition* 84:39-46.
3. Gorog, P. and Kovacs, I. B. 1978. Anti-inflammatory effect of sialic acid. *Agents and Actions* 8:543-545.
4. Iijima, R., Takahashi, H., Namme, R., Ikegami, S. and Yamazaki, M. 2004. Novel biological function of sialic acid (N-acetylneuraminic acid) as a hydrogen peroxide scavenger. *FEBS Letters* 561:163-166.
5. Kelleher, S. L., Chatterton, D., Nielsen, K. and Lonnerdal, B. 2003. Glycomacropeptide and α -lactalbumin supplementation of infant formula affects growth and nutritional status in infant Rhesus monkeys. *Am. J. Clin. Nutr.* 77: 1261-1268.
6. Kilara, A. and Panyam, D. 2003. Peptides from milk proteins and their properties. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 43:607-633.
7. Korea Food and Drug Administration (KFDA). 2015. Guidelines for toxicity tests in drugs, etc. KFDA Notice No. 2014-67 (Feb. 12).
8. Korea Food and Drug Administration (KFDA). 2014. The above study was conducted in accordance with the Ministry of Food and Drug Safety. KFDA Notice No. 2014-136 (Jul. 30.).
9. Maron, D. M. and Ames, B. N. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.* 113:173-215.
10. Marshall, S. C. 1991. Casein macropeptide from whey. A new product opportunity. *Food Res. Quar.* 15:86-91.
11. Moon, Y. I., Lee, W. J. and Oh, S. J. 2005. Glycomacropeptide hydrolysed from bovine κ -casein; II. Chromatographic changes of κ -casein macropeptide as related to Trichloroacetic acid concentration. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 17(1):478-482.
12. Organization for Economic Cooperation and Development. 2008. OECD Guidelines 408 for the testing of chemicals: Repeated Dose 90 day Oral Toxicity Study in Rodents.
13. Organization for Economic Cooperation and Development. 1993. OECD guideline for the testing of chemicals, 'Guidelines for the management of non-clinical studies' OECD Test guidelines (No. 473) and GLP Center Standard Operating

Procedures.

14. Schauer, R. and Wien, S. V. 1984. Sialic acids: Chemistry, metabolism and function. *Carbohydrate Research* 129:5-7.
15. Takahashi, N., Asakawa, S., Shunichi, D. and Tadashi, I. 1992. Hypoallergenic nutritive composition. French Pat. Appl. Fr 2667 850A1.
16. Wang, B. 2009, Sialic acid is an essential nutrient for brain development and cognition. *Annu. Rev. Nutr.* 29:177-222.
17. Wang, B., Brand-Miller, J., McVeagh, P. and Petocz, P. 2001. Concentration and distribution of sialic acid in human milk and infant formulas¹⁻³. *Am. J. Clin. Nutr.* 74:510-515.
18. Wang, B. and Brand-Miller, J. 2003. The role and potential of sialic acid in human nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition* 57:1351-1369.
19. Wang, B., Yu, B., Karim, M., Hu, H., Yun, S., McGreevy, P., Petocz, P., Held, S. and Brand-Miller, J. 2007. Dietary sialic acid supplementation improves learning and memory in piglets¹⁻³. *Am. J. Clin. Nutr.* 85:561-569.
20. Yoon, Y. C., Cho, J. K., Song, C. H., Lee, S. and Chung, C. I. 2000. Purification of the glycomacropptide from cheese whey. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* 20:159-165.

Received June 8, 2016

Revised June 15, 2016

Accepted June 22, 2016